

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT  
FÜSIOLOOGIA OSAKOND

Silvia Jänes

**Tõstetud pluss-puuri mõju endoplasmaatilise retiikulumi stressiga seotud geenide  
ekspressioonile Wfs1-puudulikkusega hiirtel**

Magistritöö 30 EAP  
Geenitehnoloogia

Juhendajad PhD Silva Sütt  
PhD Lilian Kadaja-Saarepuu  
MSc Alina Altpere

TARTU 2016

## INFOLEHT

### **Tõstetud pluss-puuri mõju endoplasmaatilise retiikulumi stressiga seotud geenide ekspressioonile Wfs1-puudulikkusega hiirtel**

Wolframi sündroom on autosomaalne retsessiivne neurodegeneratiivne haigus, mis on põhjustatud mutatsioonidest *WFS1* geenis ning mille sümptomite hulka kuuluvad lisaks varasele diabeedile ja optilisele atroofiale ka erinevad neuroloogilised häired. Voltumata valkude kuhjumine ER-is aktiveerib UPR-i, mille tulemusel kas taastatakse ER-i homöostaas või suunatakse rakud apoptoosi. Erinevates ajuosades kõrgelt ekspresseeruv Wfs1 valk osaleb ER-stressi vastuse tekkimisel ning on näidatud, et Wfs1-puudulikkusega hiired on tõstetud pluss-puuris ärevamad. Sellest tulenevalt uuriti pluss-puuri mõju erinevatele ER-stressi vastuse geenide ekspressioonile nii Wfs1-puudulikkusega kui metsiktüüpi hiirte ventraalses striatumis, hipokampuses ja oimusagaras, kasutades kvantitatiivse reaalaja PCR ning *Western-blot* meetodeid. Tulemused näitavad, et tõenäoliselt suunatakse Wfs1-puudulikkusega loomadel stressitingimustes rakud apoptoosi.

Märksõnad: ER-stress, Wfs1-puudulikkusega hiir, UPR, tõstetud pluss-puur, ärevus

CERCS kood: B470 Füsioloogia

### **The effects of elevated plus-maze on endoplasmatic reticulum stress related genes in Wfs1-deficient mice**

Wolfram syndrome is an autosomal recessive neurodegenerative disorder caused by mutations in the *WFS1* gene and characterized by different neurological disorders in addition to juvenile-onset diabetes mellitus and optic atrophy. Accumulation of unfolded proteins in the ER cause activation of the UPR through which the cell can either restore the homeostasis of the ER or activate apoptotic pathways. WFS1 protein which is strongly expressed in different parts of the brain participates in ER-stress response pathways and it is shown that Wfs1-deficient mice have increased anxiety after exposure to the EPM. Hence we examined the effect of the EPM on ER stress related genes in ventral striatum, hippocampus and temporal lobe of Wfs1-deficient homozygous and wildtype mice using quantitative real-time PCR and Western-blot methods. The results indicate that Wfs1-deficient mice can't probably subsist through ER stress and thus activate apoptotic pathways.

Keywords: ER stress, Wfs1-deficient mice, UPR, EPM, anxiety

CERCS code: B470 Physiology

# SISUKORD

LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. WFS1 ja Wolframi sündroom.....	6
1.2. Wfs1-puudulikkusega hiir.....	7
1.3. ER-stress .....	7
1.4. ER-stressi rajad .....	8
1.4.1. IRE1 rada.....	10
1.4.2. PERK rada .....	10
1.4.3. ATF6 rada.....	11
1.5. WFS1 ja ER-stress .....	11
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	12
2.1. Töö eesmärgid.....	12
2.2. Materjal ja metoodika .....	12
2.2.1. Katseloomad .....	12
2.2.2. Tõstetud pluss-puur .....	12
2.2.3. Aju prepareerimine .....	13
2.2.4. Kvantitatiivne reaalaaja PCR .....	13
2.2.5. Valgu eraldamine ja kudede fraktsioneerimine .....	14
2.2.6. Western blot.....	15
2.3. Tulemused.....	15
2.3.1. ER-stressiga seotud geenide ekspressioon mRNA ja valgu tasemel ventraalses striatumis .....	15
2.3.2. ER-stressiga seotud geenide ekspressioon mRNA ja valgu tasemel hipokampuses .....	19
2.3.3. ER-stressiga seotud geenide ekspressioon oimusagaras .....	22
2.4. Arutelu .....	25
KOKKUVÕTE .....	28
SUMMARY .....	30
TÄNUAVALDUSED.....	32
KASUTATUD KIRJANDUS .....	33
LIHTLITSENTS.....	41

## LÜHENDID

ATF	Aktiveeriv transkriptsioonifaktor
C/EBP	CCAAT-võimendajaga seonduvad valgud ( <i>CCAAT-enhancer binding proteins</i> )
cDNA	Komplementaarne DNA
CHOP	CCAAT-võimendajaga seonduva valguga homoloogiline valk ( <i>CCAAT-enhancer binding protein homologous protein</i> )
eIF2 $\alpha$	Eukarüootse initiatsioonifaktor 2 $\alpha$ -subühik
EDTA	Etüleendiamiintetraädikhape ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EPM	Tõstetud pluss-puur ( <i>elevated plus-maze</i> )
ERSE	Endoplasmaatilise retiikulumi stressi vastuse element
GRP	Glükoosi reguleeritud proteiin
HEPES	4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape ( <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> )
Hprt	Hüpoksantiin fosforibosüültransferaas
HRD1	Endoplasmaatilise retiikulumiga seotud valgu degradatsiooniraja E3 ubikvitiinligaas
IRE1	Inositol-sõltuv ensüüm 1 ( <i>Inositol-requiring enzyme 1</i> )
PBS	Fosfaatpuhveris soolade lahus
PCR	Polümeraasi ahelreaktsioon ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PERK	Proteiinikinaas-RNA-laadse endoplasmaatilise retiikulumi kinaas ( <i>protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase</i> )
PVDF	Polüvinüülideenfluoriid
RIPA	Radioimmunosadestamise katse puhver
SDS-PAGE	Naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiidgeel-elektroforees
UPR	Voltumata valgu vastus ( <i>unfolded protein response</i> )
WFS1	Wolframi sündroomi 1 geen või valk inimesel
Wfs1	Wolframi sündroomi 1 geen või valk inimesest erinev liigil
XBP1	X-box-ga seonduv valk 1
XBP1s	Splaissitud XBP1 valk
XBP1u	Splaissimata XBP1 valk

## SISSEJUHATUS

Mutatsioonid *WFS1* geenis põhjustavad Wolframi sündroomi, mille sümptomiteks on suhkru- ja magediabeet, optiline atroofia, kurtus ning muud neuroloogilised häired (Wolfram ja Wagener, 1938; Inoue *et al.*, 1998, Strom *et al.*, 1998). Erinevates ajuosades kõrgelt ekspresseeruva *Wfs1* geeniprodukt osaleb endoplasmaatilise retiikulumi stressi (ER-stressi) vastuse radades (Takeda *et al.*, 2001; Luuk *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2010).

ER-stressi põhjustab voltumata valkude kuhjumine ER-ile, mille tulemusena käivitub voltumata valkude vastus (UPR), mis kas taastab ER-i homöostaasi või suunab raku apoptoosi. UPR on vahendatud transmembraansete ER-i signaalvalkude PERK, IRE1 ja ATF6 poolt (Shamu ja Walter, 1996; Schroder ja Kaufman, 2005; Ron ja Walter, 2007).

IRE1 käitub ER-stressi sensorina, tundes ER-is ära voltumata valke, ning osaleb aktiivse transkriptsioonifaktori XBP1s mRNA splaissimisel, mis omakorda indutseerib tuumas tsäperongenide transkriptsiooni ning inhibeerib ER-stressi poolt indutseeritud apoptoosi (Yoshida *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2013). ATF6 $\alpha$  on *WFS1*-ga seotud olev valk, mis aktiveerib tuumas ER-stressi vastuse tekkeks vajalike geenide ekspressiooni (Ye *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2010). CHOP inhibeerib rakus transkriptsiooni ning paneb nad kasvuaresti ning PERK peatab translatsiooni, vähendades kuhjuvate valkude arvu ER-is (Harding *et al.* 1999; Barone *et al.*, 1994).

Sellest tulenevalt oli käesoleva Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditiini instituudi füsioloogia osakonnas valminud töö eesmärgiks uurida ER-stressiga seotud geenide (*Perk*, *Chop*, *Irela*, *Xbp1* ja *Atf6a*) ekspressiooni nii mRNA kui valgu tasemel *Wfs1*-puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirtel ning tõstetud pluss-puuris käinud samade genotüüpidega loomadel. Ekspressiooni mõõdeti kolmes ajuosas, kus *Wfs1* on tugevalt ekspresseeritud, ning mis on seotud ärevuse regulatsiooniga (Luuk *et al.*, 2008).

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. WFS1 ja Wolframi sündroom

*WFS1* on inimesel 4. kromosoomi 16.1 piirkonnas paiknev kaheksast eksonist koosnev geen, mis kodeerib 890 aminohappe pikkust valku wolframiin. Wolframiin on ER-i membraanis paiknev 100 kDa suurune transmembraanne glükoproteiin, millel on üheksa hüdrofoobset transmembraanset domääni ning suured hüdrofiilsed piirkonnad mõlemas terminuses (Takeda *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2003; Philbrook *et al.*, 2005).

Endogeenset wolframiini ekspresseeritakse kõige rohkem südames, ajus, platsentas, kopsus ja kõhunäärme  $\beta$ -rakkudes (Inoue *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998; Ishihara *et al.*, 2004). Ajus on *Wfs1* ekspressioon kõige suurem dorsaalses ja ventraalses striatumis, amügdalas, ajukoores, hipokampuses ning allokorteksis (Takeda *et al.*, 2001; Philbrook *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2008; Luuk *et al.*, 2008).

Wolframi sündroom on autosomaalne retsessiivne haigus, mis on põhjustatud mutatsioonidest *WFS1* geenis (Inoue *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998; Marshall *et al.*, 2013; Blanco-Aguirre *et al.*, 2015). Valdav osa haigust tekitavatest mutatsioonidest on toimunud *WFS1* geeni 8. eksonis, kuid seni pole selget genotüübi ja fenotüübi vahelist korrelatsiooni haiguse tekkel kindlaks määratud (Strom *et al.*, 1998; Chaussenot *et al.*, 2011; Rigoli *et al.*, 2011). Sõltuvalt etnilisest kuuluvusest on haiguse esinemissagedus 1/770 000 kuni 1/54 478 (Barrett ja Bunday, 1997; Lombardo *et al.*, 2014).

Wolframi sündroomi (OMIM 222300) kirjeldati esmakordselt 1938. aastal Wolframi ja Wageri poolt ning esimesteks sümptomiteks haiguse avaldumisel on suhkruhaiguse elu esimesel ja optiline atroofia teisel kümnendil (Wolfram ja Wager, 1938; Barrett *et al.*, 1995). Lisaks kuuluvad sümptomite hulka ka magediabeet ning muud endokriinsed ja neuroloogilised häired (ataksia, nüstagmid, perifeerne neuropaatia ja vaimne alaarenemine). Wolframi sündroomiga patsiendid surevad harilikult 25 – 49 aastast ajutüve atroofiast tingitud hingamisteede rikete tagajärjel (Barrett *et al.*, 1995; Rigoli *et al.*, 2011).

Wolframi sündroom kuulub progressiivsete neurodegeneratiivsete haiguste hulka, mis mõjutavad nii perifeerset kui kesknärvisüsteemi (Barrett ja Bunday, 1997). Umbes 60%-l Wolframi sündroomiga patsientidel esineb erinevaid psühhiaatrilisi häireid ning *Wfs1*-mutatsiooniga heterosügootidel on võrreldes mittekandjatega 26 korda suurem tõenäosus sattuda psühhiaatrilisele ravile (Swift *et al.*, 1990; Swift *et al.*, 1998).

## 1.2. Wfs1-puudulikkusega hiir

Praeguseks on loodud kaks erinevat Wfs1-puudulikkusega hiirt (Ishihara *et al.*, 2004; Luuk *et al.*, 2008). Tartu Ülikooli füsioloogia osakonnas on loodud Wfs1-puudulikkusega hiired, kellel on eemaldatud geeni 8. ekson (Luuk *et al.*, 2008). Võrreldes metsiktüüpi hiirtega on neil väiksem kehakaal ning madalam plasmainsuliini tase (Luuk *et al.*, 2008; Terasmaa *et al.*, 2011). Katsetega on näidatud, et Wfs1-puudulikkusega hiired on madalama lokomotoorse aktiivsusega, kuid samas ärevamad kui metsiktüüpi hiired ning Wfs1 võib omada rolli näriliste kohanemisel uudes ja stressirikas keskkonnas (Raud *et al.*, 2009; Luuk *et al.*, 2008).

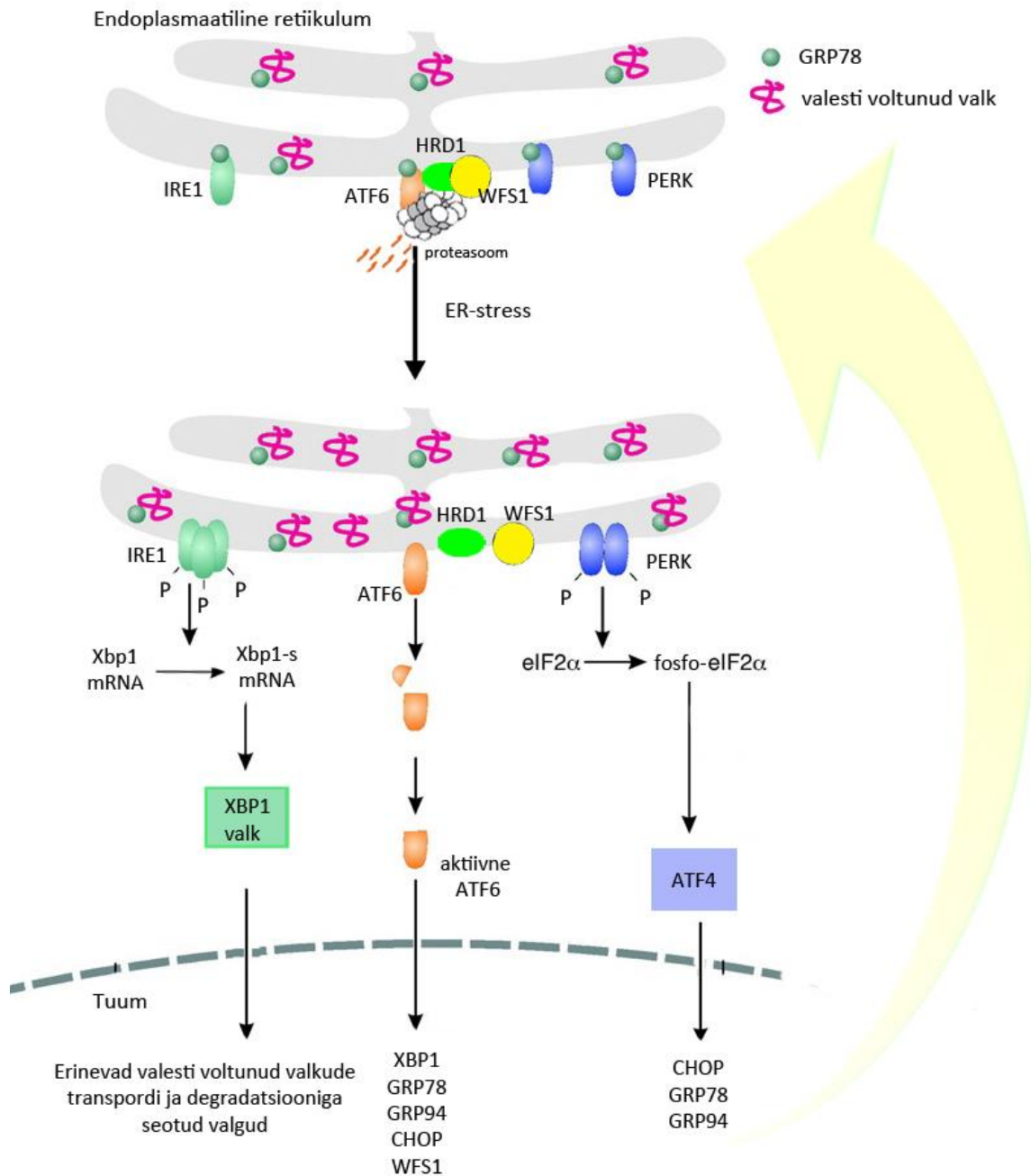
## 1.3. ER-stress

Endoplasmaatiline retiikulum vastutab valkude post-translatsiooniliste modifikatsioonide, sünteesitud valkude voltumise ja õigesti kokkupakkimise eest ning häired ER-i funktsioonis põhjustavad voltumata valkude kuhjumise ER-i luumenisse, mille tulemusena vallandatakse voltumata valgu vastus. Seda nähtust nimetatakse ER-stressiks (Kozutsumi *et al.*, 1988; Rutkowski ja Kaufman, 2007; Rigoli *et al.*, 2011). UPR-i eesmärk on leevendada stressirikast olukorda ning taastada normaalne ER-i homöostaas. Valkude voltumise protsessi ER-is stabiliseerivad  $\text{Ca}^{2+}$ -sõltuvad kalretikuliin, kalneksiin ja molekulaarsed tšaperonid GRP78 ning GRP94 (GRP – glükoosi reguleeritud valk) (Orrenius *et al.*, 2003; Ma ja Hendershot, 2004; Schroder ja Kaufman, 2005). Stressitingimustega kohanemiseks on vajalik indutseerida ER-i valkude voltumisvõimet taastavate geenide ekspressioon ning ajutiselt inhibeerida mRNA translatsioon, takistamaks uute valkude kuhjumist ER-i. Kui kohanemine ei õnnestu, aktiveeritakse raku kaitseks mediaatoreid kodeerivate geenide ekspressioon. Intensiivse ning pikaajalise ER-stressi korral käivitatakse raku programmeeritud surm – apoptoos (Lee *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2005; Li ja Lee, 2006; Kardosh *et al.*, 2008).

#### 1.4. ER-stressi rajad

ER-stressi vastus on jagunenud kolme raja vahel, mis tagavad raku homöostaasi säilitamiseks vajalike geenide ekspressiooni ning on vahendatud transmembraansete ER-i signaalvalkude proteiini kinaas RNA-sarnase ER kinaasi (PERK), inositol-sõltuva ensüüm 1 (IRE1) ja aktiveeriva transkriptsioonifaktor 6 (ATF6) poolt (Schröder ja Kaufman, 2005). Raku normaalolekus on signaalvalgud inaktiivsed ja seotud GRP78-ga, kuid ER-stressi tingimustes vabanevad GRP78-lt ning aktiveeruvad (Xu *et al.*, 2005; Ron ja Walter, 2007). GRP78-lt vabanenud IRE1 oligomeriseerub, autofosforüleerub ning on seejärel võimeline viima XBP1 tema aktiivsesse splaissitud vormi, mis aktiveerib valgu voltumise ja degradatsiooniga seotud geenide ekspressiooni. Tavaolekus aitab WFS1 ATF6 $\alpha$ -l interakteeruda HRD1-ga (endoplasmaatilise retiikulumiga seotud degradatsiooniraja E3 ubikvitiinligaas), mis märgistab ATF6 $\alpha$  proteasoomseks degradatsiooniks ubikvitiiniga. ATF6 vabanemine GRP78-lt põhjustab ATF6 aktiveerumise Golgis ning translokeerumise tuuma, kus indutseerib endoplasmaatilise retiikulumi vastuse elemente (ERSE) sisaldavate geenide, kaasaarvatud *Chop* ja *Xbp1*, ekspressiooni. GRP78-lt vabanedes PERK dimeriseerub ja autofosforüleerub, moodustades aktiivse PERK-i, mis fosforüleerib ja inaktiveerib eIF2 $\alpha$ , inhibeerides üldist *cap*-sõltuvat translatsiooni, kuid lubades sisemise ribosoomi sisenemise saidiga RNA-de, näiteks *Chop* translatsiooni (Healy *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2010) (Joonis 1).





**Joonis 1.** Voltumata valgu vastuse poolt indutseeritud kolme signaalraja skeem. Tavatingimustes seob GRP78 IRE1, ATF6 ja PERK-i hoides neid inaktiivsetena, kuid voltumata valkude kuhjumine ER-stressi tingimustes põhjustab GRP78 vabanemise IRE1, ATF6 ja PERK-ilt, lubades nende aktivatsiooni (täiendatud Healy et al., 2009; Fonseca et al., 2010).

### 1.4.1. IRE1 rada

Imetajatel on kaks *Xbox*'ile seonduva valgu 1 (XBP1 – *human Xbox binding protein 1*) isovormi: splaissimata XBP1 (XBP1u) ja splaissitud XBP1 (XBP1s) (Shen *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001)

Imetajate genoom kodeerib ka kahte IRE1 isovormi: vitaalse tähtsusega IRE1 $\alpha$  ja IRE1 $\beta$  (Tirasophon *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). Stressitingimustes on IRE1 seotud raku homöostaasi taastamisega, kuid raku suutmatus ER-stressiga toime tulla viib apoptoosi suunavate radade käivitamiseni (Lin *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2014).

Kõigis eukarüootides konserveerunud IRE1 on ER-i transmembraanne multidomäänne kinaas/endoribonukleas, mille ER-i lumenipoolne domään tunneb stressitingimustes ära voltumata valgud ning oligomeriseerub (Shamu ja Walter, 1996; Bertolotti *et al.*, 2000; Credle *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006). Seejärel toimub kinaasi autofosforülatsioon ning IRE1 ribonukleasi aktivatsioon, mis lõikab sait-spetsiifiliselt *Xbp1* mRNA 26 aluspaari pikkuseks introniks, osaledes küpse transkriptsioonifaktori XBP1s tekkel ja UPR-i käivitumisel (Yoshida *et al.*, 2001; Calfon *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Tsütosoolis toimuva alternatiivse splaissimine tulemusel tehakse 267-aminohappeline valk XBP1u splaissitud 371-aminohappeliseks aktiivseks transkriptsioonifaktoriks XBP1s, mis indutseerib tuumas tsäperongenide transkriptsiooni (Shen *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001; Calfon *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003).

### 1.4.2. PERK rada

CCAAT-võimendajaga seonduvate valkudega homoloogilise valgu (CHOP) aktivatsioon toimub nii PERK kui ka ATF6 raja kaudu. Vastusena ER-stressile PERK autofosforüleerub ning fosforüleerib omakorda eIF2 $\alpha$  (eukarüootse initsiatsioonifaktor 2  $\alpha$ -subühik), mis peatab raku translatsiooni initsiatsiooni, kuid suurendab ATF4 taset ning tema sihtmärk geeni *Ddit3* poolt kodeeritud CHOP valgu hulka rakus (Harding *et al.*, 1999; Ron ja Walter, 2007; Tabas ja Ron, 2011).

CHOP on väike C/EBP (CCAAT-*enhancer binding proteins*) perekonda kuuluv 29 kDa suurune tuumavalk, mis tavatingimustes paikneb inaktiivsena tsütoplasmas, kuid stressitingimustel akumuleerub tuuma, kus dimeriseerub teiste C/EBP perekonna valkudega, moodustades kompleksi, mis ei lase neil seonduda perekonnale omasele CCAAT järjestusele, inhibeerides rakus transkriptsiooni. Pikaajaline CHOP ekspressioon suunab raku apoptoosi (Ron ja Habener, 1992; Barone *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1996).

### 1.4.3. ATF6 rada

ATF6 on 90 kDa suurune endoplasmaatilise retiikulumi transmembraanne valk, millel on kaks isovormi ATF6 $\alpha$  ja ATF6 $\beta$  (Haze *et al.*, 1999; Haze *et al.*, 2001). ATF6 $\alpha$  aitab ER-stressi ajal optimiseerida valkude voltumist, sekretsiooni ja degradatsiooni ning rakul pärast pikaajalist ER-stressi taastuda (Wu *et al.*, 2007). ATF6 aktiveeritakse vastusena ER-stressile, mis indutseerib ATF6 liikumise Golgi kompleksi, kus proteolüüsi käigus saadakse valgu 50 kDa suurune aktiivne vorm, mis liigub edasi tuuma ning aktiveerib ER-stressi vastusega seotud geenide ekspressiooni (Yoshida *et al.*, 1998; Haze *et al.*, 1999; Haze *et al.*, 2001). ATF6 indutseerib otseselt *Xbp1* ekspressiooni, mis on vajalik transkriptsiooniliselt aktiivse XBP1s tekkeks (Guo *et al.*, 2013).

### 1.5. WFS1 ja ER-stress

WFS1 on ER-stressi vastust reguleeriv UPR komponent, mille puudumine võib viia raku püsivasse stressiseisundisse, mille tulemusena indutseeritakse apoptoos (Fonseca *et al.*, 2005). WFS1 moodustab normaalingimustel kompleksi ATF6 $\alpha$  ja HRD1-ga, mille tulemusel suunatakse ATF6 $\alpha$  proteasoomi degradeerimisele ning surutakse negatiivse tagasiside kaudu maha ER-stressi vastus. ER-stressi korral antud kompleks laguneb, sest WFS1 ei suuda HRD1 enam stabiliseerida ning ATF6 $\alpha$  vabaneb degradatsioonirajast ning translokeerub tuuma, kus indutseerib UPR geenide (sh *Grp78* ja *Xbp1*) ning hiljem ka *Wfs1* ekspressiooni, mis aitab taastada ER-i homöostaasi suunates ATF6 $\alpha$  uuesti degradeerimisele (Joonis 1). Wfs1-puudulikkuse tagajärjel tekib aga ATF6 $\alpha$  hüperaktivatsioon, mis suunab rakud apoptoosi (Fonseca *et al.*, 2010). Lisaks ATF6-le on näidatud, et ka XBP1 indutseerib neuronites Wfs1 ekspressiooni (Kakiuchi *et al.*, 2006).

Bipolaarse häire, epilepsia ja migreeni raviks kasutatav valproaat suurendab vaba WFS1 hulka, aktiveerides *Wfs1* transkriptsiooni ning vähendades GRP94 ja WFS1 vahelist dissotsiatsiooni, jättes seejuures mõjutamata teiste ER-stressi markerite (GRP78, GRP94, XBP1u, XBP1s ja ATF6) ekspressiooni. Seega võivad valproaadi terapeutilised omadused olla osaliselt vahendatud ER-stressi moduleerimise kaudu (Rosenberg, 2007; Johannessen *et al.*, 2000; Johannessen ja Johannessen, 2003; Kakiuchi *et al.*, 2009).

## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida ER-stressiga seotud geenide (*Xbp1*, splaissitud *Xbp1*, *Irela*, *Chop*, *Atf6a*, *Perk*) ekspressiooni mRNA ja valgu tasemel stressitingimustes Wfs1-puudulikkusega hiirte ja metsiktüüpi hiirte ventraalses striatumis, hipokampuses ja oimusagaras.

### **2.2. Materjal ja metoodika**

#### **2.2.1. Katseloomad**

Katseloomadeks olid emased Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditiini instituudi füsioloogia osakonnas valmistatud Wfs1-puudulikkusega homosügootsed (Luuk *et al.*, 2008) ning kontrolliks metsiktüüpi hiired. Katseloomad, kelle geneetiline taust oli (129/SVEVS6/tac x C57bl/6J) x (129/SVEVS6/tac x C57bl/6J), paljundati ja genotüpiseeriti Tartu Ülikooli arstiteaduskonna füsioloogia osakonnas. 3 – 4 kuuseid loomi hoiti puurides 8 - 10 kaupa 12-h/12-h valge/pime tsüklis 22°C juures (valge tsükkel algas kell 7 hommikul). Hiirtel oli vaba ligipääs toidule ja veele ning loomkatsed toimusid kella 10:00 ja 17:00 vahel. Kõik katsed teostati Eesti Vabariigi põllumajandusministeeriumi poolt välja antud loa alusel (number 88, välja antud 25 august 2011).

#### **2.2.2. Tõstetud pluss-puur**

Testis kasutatakse neljast õlast koosnevat pluss-puuri, millel on kaks avatud ja kaks suletud õlga. Avatud õlgadel puuduvad seinad ning suletud õlad on kolmest küljest ümbritsetud 14 cm kõrguste seintega. Puuri kandvate õlgade pikkus keskkoha suhtes on 17,5 cm ning laius 5 cm. Pluss-puur asub maapinnast 30 cm kõrgusel ning on asetatud hämarasse ruumi. Avatud õlgadele liikumise julgustuseks ning loomadele haarde tagamiseks, on nende äärtesse paigutatud 0,25 cm kõrgused servad.

Iga katseloom läbis puuris standardse 5-minutilise sessiooni (Lister 1978), pärast mida puhastati puur 75% etanooli vesilahusega. Katse läbiviimiseks asetati hiir pluss-puuri keskele, näoga avatud õla suunas. Õlgadele väljumist arvestati vaid juhul kui kõik neli jäset viibisid antud õlal. Katsesessioonid salvestati puuri kohale kinnitatud kaamera abil ning andmete töötlus toimus spetsialisti poolt kogutud videomaterjali põhjal. Katseandmete analüüsil

mõõdeti: avatud ja suletud õlgadele väljumiste arvu kordades, avatud ning suletud õlgades viibitud aega sekundites, kõigi õlgade ja avatud õlgade külastuste suhet, õlgade kõige kaugemasse otsa liigutud kordade arvu ja puuri keskossa liigutud kordade arvu.

### **2.2.3. Aju prepareerimine**

Katseloomad surmati tservikaalse dislokatsiooni teel. Kolju jahutati vedelas lämmastikus ning eemaldati aju, mis prepareeriti jääl ning mille käigus eraldati ventraalne striatum, hipokampus ja oimusagar. Eraldatud struktuurid külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80 °C juures.

### **2.2.4. Kvantitatiivne reaalaaja PCR**

RNA eraldamiseks kasutati Trizol reagenti (Invitrogen) ning cDNA sünteesimiseks Superscript III pöördtranskriptaasi (Invitrogen) ja oligo dT18 oligonukleotiide vastavalt etteantud protokollidele. Kvantitatiivse reaalaaja PCR-i teostamiseks kasutati QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR süsteemi (PE Applied Biosystems, USA) ja QuantStudio™ 12K Flex versioon 1.2.2 tarkvara. Praimerid sünteesiti programmiga Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA) ekson-ekson ühenduskohtadesse vältimaks genoomse DNA ekspressiooni. Praimerite järjestused ja Taqman sondid on toodud tabelis 1. Sisemise kontrollina kasutati koduhoidja geeni *Hprt1*, mida on näidatud kui kõige efektiivsemalt ja stabiilsemalt ekspresseeruvat geeni (Raud *et al.*, 2009). Kasutati Taqman süsteemi tehnoloogiat (PE Applied Biosystems) vastavalt etteantud protokollile. Kõik reaktsioonid teostati neljas korduses, et vähendada võimalikke vigu. Reaktsioonide lõppmahuks oli 10 µl, kasutades 50-100 ng cDNA-d. Paralleelselt viidi läbi kõigi nelja grupi ekspressioonid. Ekspressiooni analüüsimiseks kasutati  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001) ning statistika teostati kahesuunalise ANOVAGA kasutades GraphPad Prism versioon 6 (GraphPad Software, Inc.) ja Statistica 10 (StatSoft, USA) tarkvara.

**Tabel 1.** Kvantitatiivse-reaalaja PCR-i Taqman assayd, praimerid ja proovid.

Geen	Assay ID või järjestus	Geeni ID
Eif2ak3_for	5'-TGGTTGGAGGGAAATCTCTG-3'	NM_010121
Eif2ak3_rev	5'-CATCCCAAGGCAGAACAGAT-3'	
Eif2ak3_probe	5'-6-FAM-GCTTACAGTGGAAAGCTGAGG-3'	
Ddit3_for	5'-CCAGGAAACGAAGAGGAAG-3'	NM_007837
Ddit3_rev	5'CCTCTGTCAGCCAAGCTAG-3'	
Ddit3_probe	5'-6-FAM-TTCACTACTCTTGACCCTGCG-3'	
Irela_for	5'-TCATCACTTACCCCTGAGC-3'	NM_023913
Irela_rev	5'-TTCTGGAAGTGTGGTGCTG-3'	
Ern1_probe	156-FAM/GTGCAT LOT 41023/1	
Xbp1_total_for	5'-AAGAACACGCTTGGGAATGG-3'	NM_013842
Xbp1_total_rev	5'-ACTCCCCTTGGCCTCCAC-3'	
Xbp1_total_probe	5'-6-FAM-CACGCTGGATCCTG-MGB-3'	
Xbp1_spliced_for	5'-TGCTGAGTCCGCGCAGG-3'	
Xbp1_spliced_rev	5'-TCAGAGTCCATGGGAAGATGT-3'	
Atf6α	Mm01295317_m1	NM_001081304
Hprt1_for	5'-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3'	NM_013556
Hprt1_rev	5'- AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3'	
Hprt_probe	5'-AAGCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCG-3'	

### 2.2.5. Valgu eraldamine ja kudede fraktsioneerimine

Eemaldatud ventraalse striatumi, hipokampuse ja oimusagara koed homogeniseeriti STM puhvris (250 mM sahharoos, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>), kuhu lisati 1mM proteaasi ning fosfataasi inhibiitorkokteili (Sigma). Proovid tsentrifuugiti seejärel 15 minutit 800 g juures ning eemaldati sademelt tsütosooli fraktsioon. Tuumafraktsiooni puhtuse tagamiseks korrati sademe pesu kaks korda STM puhvriga ning seejärel resuspendeeriti sade NET puhvris (20 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 20% glütserool, 1% Triton-x-100), kuhu lisati proteaasi ning fosfataasi inhibiitorkokteili (Sigma). Tuumad lüüsiiti sonikeerimise teel ning proovid tsentrifuugiti 30 minutit 9000 g juures (Dimauro *et al.*, 2012) ning saadud fraktsioone säilitati -80°C juures. Valgu kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati Thermo Scientific BCA kitti (Pierce, Rockford, IL, USA). ning tulemused detekteeriti TECAN Sunrise Remote spektrofotomeetri ning Magellan V 7.2 programmiga.

### 2.2.6. Western blot

Valguproovid lahutati 10%-lise SDS-PAGE meetodil ja kanti seejärel üle PVDF membraanile (Renart *et al.*, 1979; Towbin *et al.*, 1979), mida blokeeriti 5% lõssipulbri lahusega. Järgnevalt inkubeeriti membraanid spetsiifilise primaarse antikehaga: Xbp1 (1:350; Santa Cruz Biotechnology, INC), pIRE1 $\alpha$  (1:1000; Thermo Scientific), GADD153 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, INC), ATF6 $\alpha$  (1:500; Santa Cruz Biotechnology, INC) või  $\beta$ -aktiin (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) üleöö loksutil +4°C juures. Membraani pesti 3x10 minutit PBST-s ning inkubeeriti seejärel 1 tund toatemperatuuril HRP-ga konjugeeritud hiire IgG sekundaarse antikeha lahusega (lahjendusega 1:10000; Jackson ImmunoResearch laboratories, INC) või hiire/jänese fluorestseeruva IgG sekundaarse antikehaga (lahjendusega 1:30000; Jackson ImmunoResearch laboratories, INC). Tulemuste detekteerimiseks kasutati ECL reagenti (Pierce, Rockford, IL, USA) või Odyssey<sup>®</sup> CLx (LI-COR, Inc.) ning tulemusi analüüsiti Image Studio Lite (LI-COR, Inc.), Statistica versioon 10 (StatSoft, Inc.) ja GraphPad Prism versioon 6 (GraphPad Software, Inc.) tarkvara abil.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. ER-stressiga seotud geenide ekspressioon mRNA ja valgu tasemel ventraalses striatumis

Ventraalses striatumis võrreldi *Atf6 $\alpha$* , *Perk*, *Chop*, *Ire1 $\alpha$* , kogu *Xbp1*, splaissitud *Xbp1* geenide ekspressioonitaset pluss-puuris käinud homosügootsetel *Wfs1*-puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirtel võrreldes kodupuurist võetud sama genotüübi loomadega. Lisaks vaadati valgu tasemel IRE1 $\alpha$ , XBP1s, ja CHOP'i ekspressiooni.

*Atf6 $\alpha$*  mRNA ekspressioonis võis täheldada väikest pluss-puuri erinevat mõju genotüüpidele, kus metsiktüüpi hiirtel *Atf6 $\alpha$*  ekspressioonitase pigem langes ja *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel natuke tõusis, kuid see erinevus polnud statistiliselt oluline ( $F(1;19)=0,771$ ;  $p=0,391$ ). Uuritud loomarühmade vahel puudusid märgatavaid erinevused *Atf6 $\alpha$*  mRNA ekspressioonis nii genotüüpide ( $F(1;19)=0,064$ ;  $p=0,803$ ) kui ka pluss-puuri ja kontrollgrupi loomade vahel ( $F(1;19)=0,052$ ;  $p=0,821$ ) (Joonis 2A.).

Pluss-puur genotüüpidele *Perk* mRNA ekspressioonil erinevat mõju ei avaldanud ( $F(1;19)=1,786$ ;  $p=0,197$ ). Samuti puudus statistiliselt oluline erinevus *Perk* mRNA ekspressioonis genotüüpide vahel ( $F(1;19)=0,484$ ;  $p=0,495$ ). Kahesuunaline ANOVA tuvastas statistiliselt olulise erinevuse pluss-puuris käinud ja kontrollgrupi loomade vahel

( $F(1;19)=5,663$ ;  $p=0,028$ ). Post hoc Tukey HSD test näitas küll väikest *Perk* mRNA ekspressioonitaseme tõusu pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;19)=5,663$ ;  $p=0,888$ ) ning suuremat tõusu pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel võrreldes kontrollgrupi *Wfs1*-puudulikkusega hiirtega ( $F(1;19)=5,663$ ;  $p=0,064$ ), kuid need erinevused ei olnud statistiliselt olulised (Joonis 2B.).

*Chop* mRNA ekspressioonil võis pluss-puuri mõjul täheldada metsiktüüpi hiirtel *Chop* ekspressioonitaseme tõusu ning *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel langust ( $F(1;19)=3,657$ ;  $p=0,071$ ), kuid see tulemus polnud statistiliselt oluline. Pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikel loomadel esines statistiliselt oluline *Chop* mRNA ekspressiooni langus võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi loomadega ( $F(1;19)=7,169$ ;  $p=0,024$ ). Kontrollgrupi metsiktüüpi loomadel ja *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel oli *Chop* ekspressioon ühesugune ( $F(1;19)=7,169$ ;  $p=0,944$ ). Pluss-puuri ja kontrollgrupi loomade vahel statistiliselt olulised erinevused puudusid ( $F(1;19)=1,892$ ;  $p=0,185$ ) (Joonis 2C.).

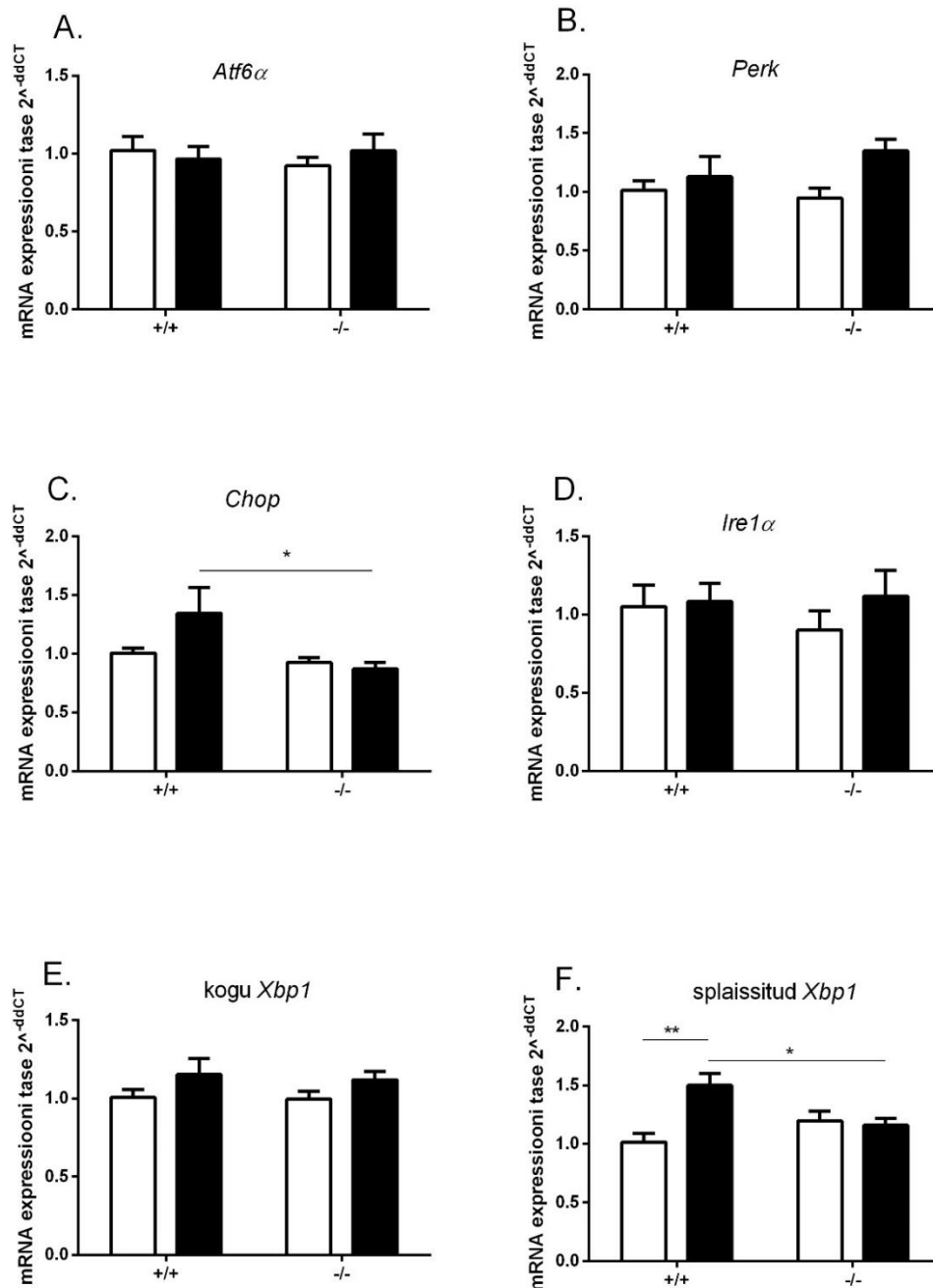
Pluss-puuril puudus *Irela* mRNA ekspressioonil genotüüpidele erinev mõju ( $F(1;19)=0,424$ ;  $p=0,523$ ). Genotüüpide vahel *Irela* mRNA ekspressioonil statistiliselt olulisi erinevusi ei esinenud ( $F(1;19)=0,174$ ;  $p=0,681$ ). Samuti puudusid statistiliselt olulised erinevused pluss-puuris käinud ning kontrollgrupi loomade *Irela* mRNA ekspressioonil ( $F(1;19)=0,790$ ;  $p=0,385$ ) (Joonis 2D.).

Pluss-puuril puudus kogu *Xbp1* mRNA ekspressioonil genotüüpidele erinev mõju ( $F(1;19)=0,030$ ;  $p=0,864$ ). Genotüüpide vahel statistiliselt oluline erinevus kogu *Xbp1* ekspressioonil puudus ( $F(1;19)=0,117$ ;  $p=0,736$ ). Kahesuunaline ANOVA tuvastas olulise erinevuse pluss-puuris käinud ja kontrollgrupi loomade vahel ( $F(1;19)=4,447$ ;  $p=0,046$ ). Post hoc Tukey HSD testi põhjal võis täheldada väikest ekspressiooni taseme tõusu pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel võrreldes kontrollgrupi metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;19)=4,447$ ;  $p=0,415$ ) ja pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi loomadega ( $F(1;19)=4,447$ ;  $p=0,513$ ), kuid need erinevused polnud statistiliselt olulised (Joonis 2E.).

Pluss-puuril oli splaissitud *Xbp1* mRNA ekspressioonil genotüüpidele oluliselt erinev mõju ( $F(1;19)=10,95$ ;  $p=0,004$ ), kus metsiktüüpi hiirtel pluss-puur indutseeris splaissitud *Xbp1* ekspressiooni, aga *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel splaissitud *Xbp1* ekspressioonitaset ei mõjutanud. Pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikel hiirtel oli võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega oluliselt madalam splaissitud *Xbp1* mRNA ekspressioonitase ( $F(1;19)=0,953$ ;  $p=0,037$ ). Metsiktüüpi kontrollgrupi hiirtel oli *Xbp1* ekspressioon madalam



kui Wfs1-puudulikkusega kontrollgrupi loomadel ( $F(1;19)=0,953$ ;  $p=0,356$ ), kuid see erinevus polnud statistiliselt oluline. Pluss-puur indutseeris splaissitud *Xbp1* ekspressiooni metsiktüüpi hiirtel võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi loomadega ( $F(1;19)=8,147$ ;  $p=0,002$ ). Wfs1-puudulikkusega hiirtel pluss-puur splaissitud *Xbp1* ekspressioonitaset ei mõjutanud ( $F(1;19)=8,147$ ;  $p=0,987$ ) (Joonis 2F.).

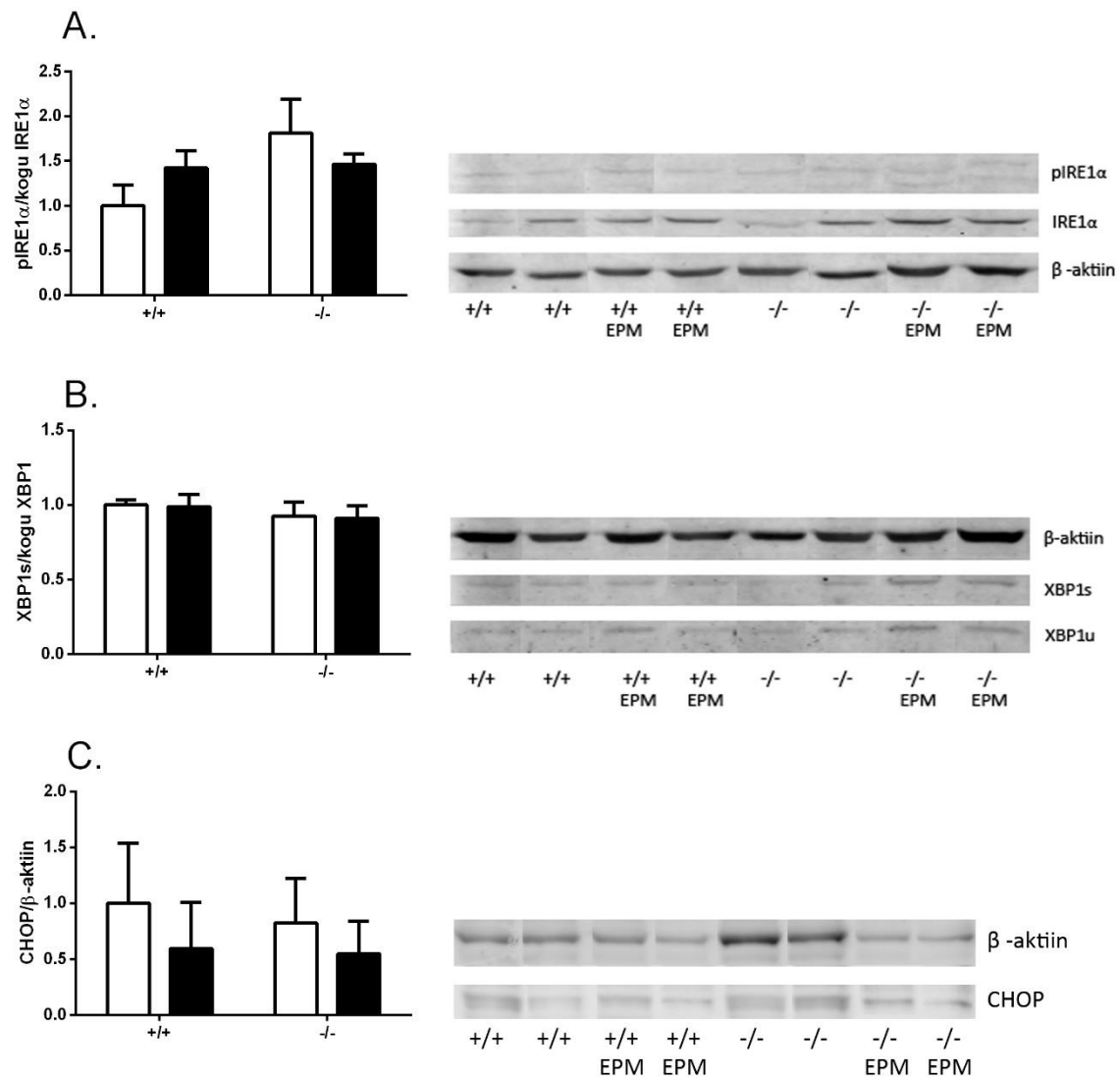


**Joonis 2.** Tõstetud pluss-puuri mõju metsiktüüpi (+/+) ja Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel (-/-) ventraalses striatumis *Atf6* (A), *Perk* (B), *Chop* (C), *Ire1α* (D), kogu *Xbp1* (E) ja splaissitud *Xbp1* (F) ekspressioonile. Valged tulbad – kontrollgrupp, mustad tulbad – tõstetud pluss-puuris käinud grupp. Igas grupis 5-6 looma.; \* $p<0,05$  võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega; \*\* $p<0,01$  võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi hiirtega.

Valgu tasemel vaadeldi pIRE1 $\alpha$  hulka võrreldes IRE1 $\alpha$  valgu koguhulgaga tsütosoolis. Võis täheldada, et pluss-puuri mõjul metsiktüüpi hiirte pIRE $\alpha$  ekspressioonitase tõusis ning Wfs1-puudulikkusega hiirte valguekspressioonitase langes ( $F(1;17)=3,064$ ;  $p=0,098$ ), kuid see erinevus ei olnud statistiliselt oluline. Kahesuunaline ANOVA genotüüpide vahel ( $F(1;17)=3,731$ ;  $p=0,070$ ) ja pluss-puuris käinud ning kontrollgrupi loomade vahel ( $F(1;17)=0,027$ ;  $p=0,871$ ) pIRE $\alpha$  ekspressioonitasemetes statistiliselt olulisi erinevusi ei tuvastanud (Joonis 3A.).

XBP1s hulga võrdlemisel XBP1 valgu koguhulgaga tsütosoolis polnud baastasemes genotüüpide vahel statistiliselt olulisi erinevusi ( $F(1;12)=0,990$ ;  $p=0,339$ ) ja puudus ka pluss-puuri mõju XBP1s valguekspressioonile ( $F(1;12)=0,0001$ ;  $p=0,991$ ). Samuti polnud statistiliselt olulist erinevust pluss-puuris käinud ja kontrollgrupi loomade XBP1 ekspressioonis ( $F(1;12)=0,028$ ;  $p=0,879$ ) (Joonis 3B.).

CHOP valgu ekspressioonis ventraalse striatumi tuumades pluss-puuril genotüüpidele erinevat mõju ei täheldatud ( $F(1;12)=0,025$ ;  $p=0,877$ ). Samuti puudusid CHOP ekspressioonil statistiliselt olulised erinevused genotüüpide vahel ( $F(1;12)=0,069$ ;  $p=0,797$ ). Võis täheldada, et pluss-puuris käinud loomadel oli CHOP ekspressioonitase madalam kui kontrollgrupi loomadel ( $F(1;12)=0,659$ ;  $p=0,433$ ), kuid see erinevus polnud statistiliselt oluline (Joonis 3C.).



**Joonis 3.** Tõstetud pluss-puuri mõju valgu tasemele metsiktüüpi (+/+) ja Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel (-/-) ventraalses striatumis: pIRE1 (A), XBP1s (B), CHOP (C). Valged tulbad - kontrollgrupp, mustad tulbad - tõstetud pluss-puuri loomad. Igas grupis 4-6 looma.

### 2.3.2. ER-stressiga seotud geenide ekspressioon mRNA ja valgu tasemel hipokampuses

Hipokampuses võrreldi samuti *Perk*, *Chop*, kogu *Xbp1* ja splaissitud *Xbp1* mRNA ekspressioonitaset pluss-puuris käinud homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirtel võrreldes kodupuurist võetud sama genotüübiga loomadega. Lisaks vaadati valgu tasemel ATF6α ja XBP1s ekspressiooni.

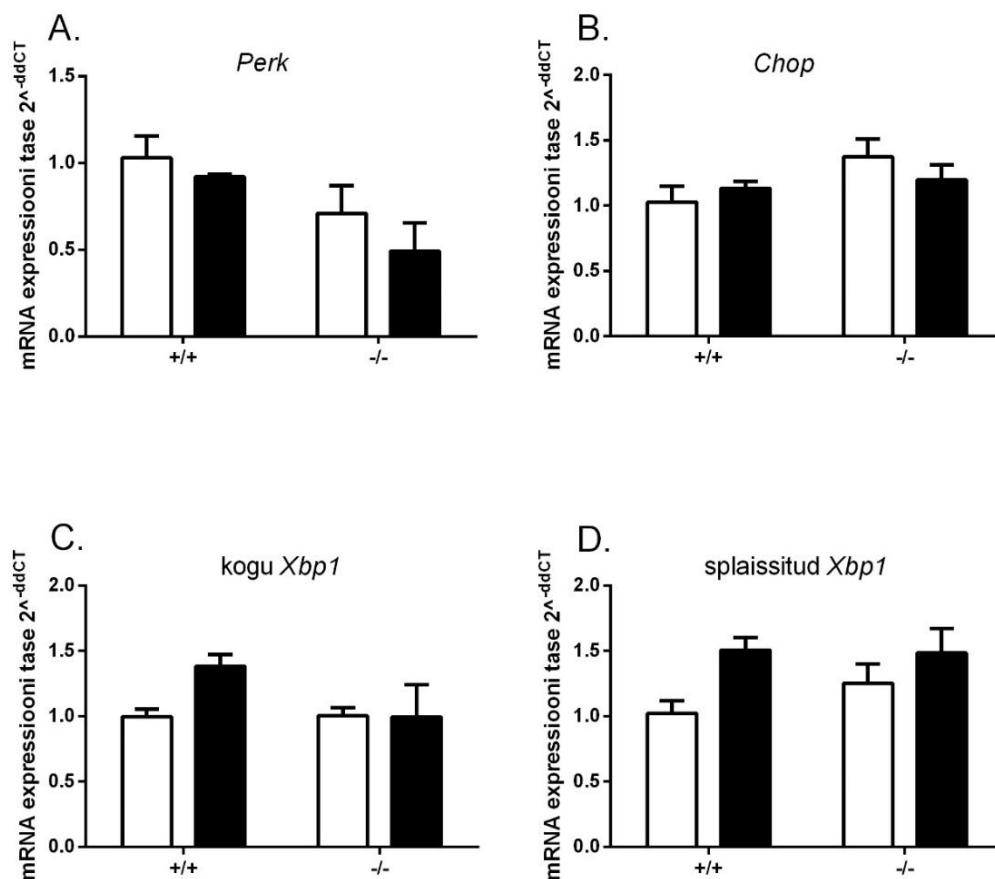
*Perk* mRNA ekspressioonil polnud pluss-puuril genotüüpidele erinevat mõju ( $F(1;20)=0,180$ ;  $p=0,676$ ). Kahesuunaline ANOVA tuvastas *Perk* ekspressioonil statistiliselt olulise erinevuse genotüüpide vahel ( $F(1;20)=8,815$ ;  $p=0,008$ ). Post hoc Tukey HSD testi järgi võis täheldada

*Perk* mRNA ekspressiooni langust *Wfs1*-puudulikkusega kontrollgrupi hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirte kontrollgrupiga ( $F(1;20)=8,815$ ,  $p=0,336$ ), kuid see polnud statistiliselt oluline. Pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel oli märgata tunduvalt madalamat *Perk* mRNA ekspressiooni võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega ( $F(1;20)=8,815$ ;  $p=0,089$ ). Statistiliselt olulised erinevused *Perk* mRNA ekspressioonis pluss-puuris käinud ja kontrollgrupi loomade vahel puudusid ( $F(1;20)=1,674$ ;  $p=0,210$ ) (Joonis 4A.).

*Chop* mRNA ekspressioonil võis täheldada pluss-puuri mõjul metsiktüüpi hiirte *Chop* ekspressioonitase natuke tõusis ja *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel natuke langes, kuid see efekt polnud statistiliselt oluline ( $F(1;20)=1,736$ ;  $p=0,203$ ). Olulist erinevust *Chop* mRNA ekspressioonil genotüüpide ( $F(1;20)=3,687$ ;  $p=0,069$ ) ning pluss-puuris käinud ja kontrollgrupi loomade vahel ( $F(1;20)=0,108$ ;  $p=0,746$ ) ei täheldatud (Joonis 4B.).

Pluss-puuri mõjul võis metsiktüüpi hiirtel täheldada kogu *Xbp1* ekspressioonitaseme tõusu, samas kui *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel *Xbp1* ekspressioonitasemes muutust polnud ( $F(1;17)=2,177$ ;  $p=0,158$ ), kuid see erinevus ei olnud statistiliselt oluline. Genotüüpide vahel ( $F(1;17)=2,023$ ;  $p=0,173$ ) ja ka pluss-puuris käinud ja kontrollgrupi loomade vahel ( $F(1;17)=1,984$ ;  $p=0,177$ ) puudusid kogu *Xbp1* mRNA ekspressioonis statistiliselt olulised erinevused (Joonis 4C.).

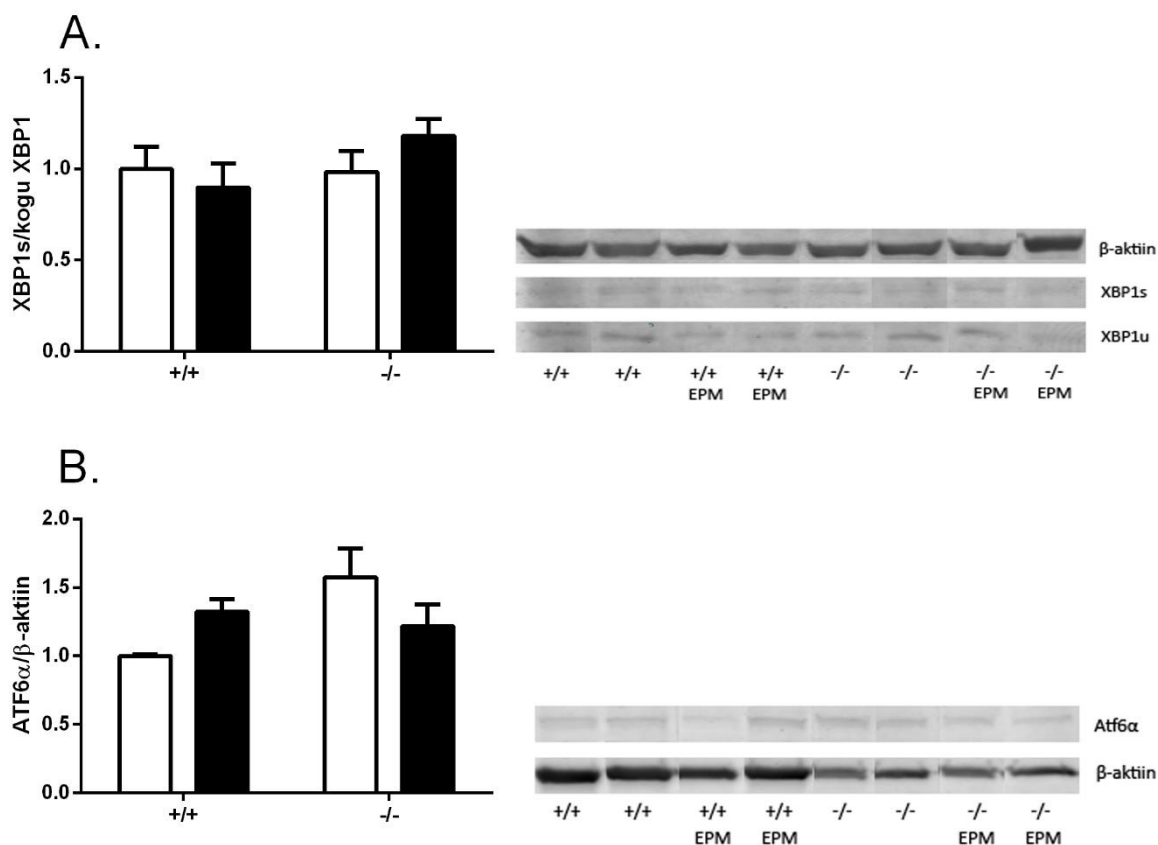
Splaissitud *Xbp1* mRNA ekspressioonil puudus pluss-puuril genotüüpidele erinev mõju ( $F(1;21)=0,815$ ;  $p=0,377$ ). Genotüüpide vahel splaissitud *Xbp1* mRNA ekspressioonis statistiliselt olulist erinevust ei täheldatud ( $F(1;21)=0,555$ ;  $p=0,465$ ). Kahesuunalise ANOVA järgi oli statistiliselt oluline erinevus pluss-puuris käinud loomade ja kontrollgrupi loomade vahel ( $F(1;21)=6,403$ ;  $p=0,019$ ). Edasine Post hoc Tukey HSD test täheldas splaissitud *Xbp1* ekspressioonitaseme tõusu nii pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi hiirtega ( $F(1;21)=6,403$ ;  $p=0,091$ ) kui ka pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi loomadega ( $F(1;21)=6,403$ ;  $p=0,680$ ), kuid need erinevused polnud statistiliselt olulised (Joonis 4D.).



**Joonis 4.** Tõstetud pluss-puuri mõju metsiktüüpi (+/+) ja Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel (-/-) hipokampuses Perk (A), Chop (B), kogu Xbp1 (C) ja splaissitud Xbp1 (D) ekspressioonile hipokampuses. Valged tulbad – kontrollgrupp, mustad tulbad – tõstetud pluss-puuris käinud loomad. Igas grupis 5-7 looma.

Hipokampuse tsütosoolis pluss-puuri erinevat mõju genotüüpidele XBP1s valguekspressioonil ei täheldatud, kuid Wfs1-puudulikkusega hiirtel oli märgata väikest ekspressiooni tõusu ( $F(1;20)=1,553$ ;  $p=0,227$ ). Genotüüpide vahel puudusid statistiliselt olulised erinevused XBP1s valgu ekspressioonil võrreldes kogu XBP1 ekspressiooniga ( $F(1;20)=1,215$ ;  $p=0,283$ ). Samuti puudusid olulised erinevused pluss-puuris käinud loomade ja kontrollgrupi loomade vahel ( $F(1;20)=0,157$ ;  $p=0,697$ ) (Joonis 5A.).

Kahesuunaline ANOVA tuvastas hipokampuse tuumades pluss-puuri erineva mõju genotüüpidele ATF6 $\alpha$  ekspressioonil ( $F(1;13)=5,551$ ;  $p=0,035$ ), kus pluss-puur indutseerib metsiktüüpi hiirte ATF6 $\alpha$  ekspressiooni, kuid alandab Wfs1-puudulikkusega hiirte ATF6 $\alpha$  ekspressiooni. Genotüüpide vahel statistiliselt olulised erinevused ATF6 $\alpha$  ekspressioonil puudusid ( $F(1;13)=2,619$ ;  $p=0,130$ ). Samuti puudusid olulised erinevused ATF6 $\alpha$  ekspressioonis pluss-puuris käinud loomade ja kontrollgrupi loomade vahel ( $F(1;13)=0,014$ ;  $p=0,907$ ) (Joonis 5B.).



**Joonis 5.** Tõstetud pluss-puuri mõju valgu tasemele metsiktüüpi (+/+) ja Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel (-/-) hipokampuses: XBP1s (A) ja ATF6 (B). Valged tulbad - kontrollgrupp, mustad tulbad - tõstetud pluss-puuri loomad. Igas grupis 4-7 looma.

### 2.3.3. ER-stressiga seotud geenide ekspressioon oimusagaras

Oimusagaras võrreldi *Perk*, *Chop*, kogu *Xbp1*, splaissitud *Xbp1* ja *Atf6α* mRNA ekspressioonitaset pluss-puuris käinud homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirtel võrreldes kodupuurist võetud sama genotüübiga loomadega.

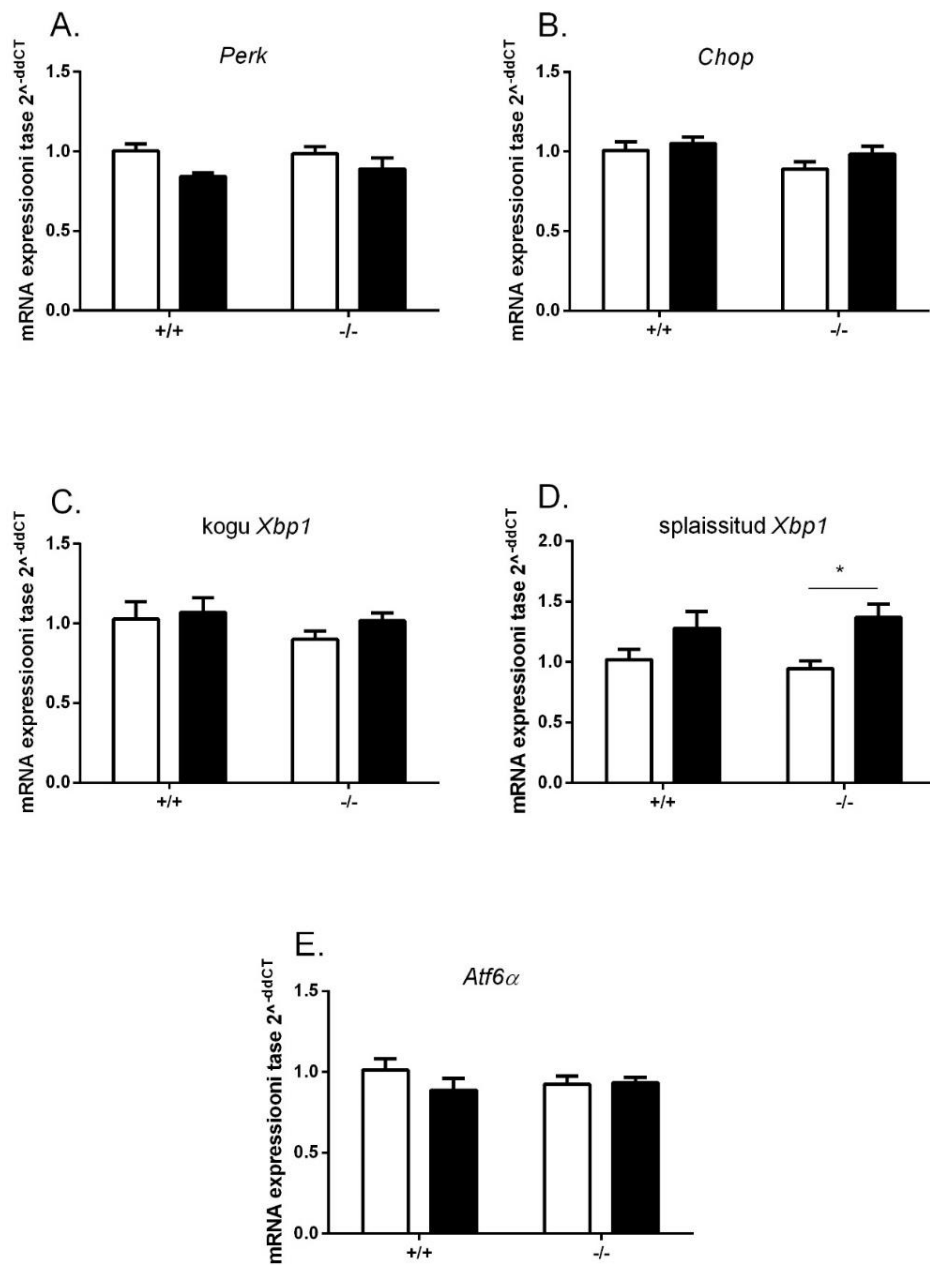
*Perk* mRNA ekspressioonil oimusagaras ei olnud pluss-puuril genotüüpidele erinevat mõju ( $F(1;20)=0,477$ ;  $p=0,498$ ). Statistiliselt olulised erinevused *Perk* mRNA ekspressioonis genotüüpide vahel puudusid ( $F(1;20)=0,103$ ;  $p=0,752$ ). Kahesuunaline ANOVA tuvastas olulise erinevuse pluss-puuris käinud loomade ning kontrollgrupi loomade vahel ( $F(1;20)=7,447$ ;  $p=0,013$ ). Post hoc Tukey testi tulemused statistiliselt olulist erinevust pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirte *Perk* mRNA ekspressioonis võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi loomadega ( $F(1;20)=7,447$ ;  $p=0,106$ ) ega ka pluss-puuris käinud Wfs1-puudulikkusega hiirte *Perk* mRNA ekspressioonis võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi loomadega ( $F(1;20)=7,447$ ;  $p=0,490$ ) ei näidanud (Joonis 6A.).

*Chop* mRNA ekspressioonil polnud pluss-puuril genotüüpidele erinevat mõju ( $F(1;20)=0,277$ ;  $p=0,605$ ). Statistiliselt olulised erinevused *Chop* ekspressioonis genotüüpide vahel puudusid ( $F(1;20)=3,803$ ;  $p=0,065$ ). Pluss-puuris käinud loomade ja kontrollgrupi loomade vahel *Chop* ekspressioonis statistiliselt olulisi erinevusi ei täheldatud ( $F(1;20)=2,145$ ;  $p=0,159$ ) (Joonis 6B.).

Pluss-puuri erinev mõju genotüüpidele kogu *Xbp1* mRNA ekspressioonil puudus ( $F(1;20)=0,230$ ;  $p=0,637$ ). Genotüüpide vahel puudus kogu *Xbp1* mRNA ekspressioonil statistiliselt oluline erinevus ( $F(1;20)=1,302$ ;  $p=0,267$ ). Samuti polnud erinevusi pluss-puuris käinud loomade *Xbp1* ekspressioonis võrreldes kontrollgrupi loomadega ( $F(1;20)=0,993$ ;  $p=0,331$ ) (Joonis 6C.).

Splaissitud *Xbp1* mRNA ekspressioonil puudus pluss-puuril genotüüpidele erinev mõju ( $F(1;20)=0,635$ ;  $p=0,435$ ). Genotüüpide splaissitud *Xbp1* ekspressioonitasemed olid üpris sarnased ( $F(1;20)=0,008$ ;  $p=0,931$ ). Kahesuunaline ANOVA näitas statistiliselt olulist erinevust pluss-puuris käinud loomade ja kontrollgrupi loomade *Xbp1* ekspressioonis ( $F(1;20)=11,06$ ;  $p=0,003$ ), mida kinnitas ka Post hoc Tukey test, kus pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel oli võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi loomadega oluliselt kõrgem *Xbp1* mRNA ekspressioonitase ( $F(1;20)=11,06$ ;  $p=0,039$ ). Pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel oli samuti märgata *Xbp1* ekspressioonitaseme tõusu võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi loomadega ( $F(1;20)=11,06$ ;  $p=0,308$ ), kuid see erinevus polnud statistiliselt oluline (Joonis 6D.).

*Atf6α* mRNA ekspressioonil oimusagaras puudus pluss-puuril genotüüpidele erinev mõju ( $F(1;20)=1,317$ ;  $p=0,265$ ). Genotüüpide vahel statistiliselt olulisi erinevusi *Atf6α* ekspressioonis ei täheldatud ( $F(1;20)=0,130$ ;  $p=0,723$ ). Samuti polnud erinevusi pluss-puuris käinud loomade ja kontrollgrupi loomade *Atf6α* mRNA ekspressioonitasemete vahel ( $F(1;20)=0,970$ ;  $p=0,723$ ). Pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel oli samasugune *Atf6α* ekspressioonitase kui sama genotüübi kontrollgrupi loomadel ( $F(1;20)=0,970$ ;  $p=0,999$ ) (Joonis 6E.).



**Joonis 6.** Tõstetud pluss-puuri mõju metsiktüüpi (+/+) ja Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel hiirtel (-/-) oimusagaras *Perk* (A), *Chop* (B), kogu *Xbp1* (C), splaissitud *Xbp1* (D) ja *Atf6* (E) ekspressioonile. Valged tulbad – kontrollgrupp, mustad tulbad – tõstetud pluss-puuris käinud grupp. Igas grupis 6 looma.; \* $p < 0.05$  võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi loomadega. s



## 2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli kirjeldada ER-stressiga seotud geenide ekspressiooni mRNA ja valgu tasemel Wfs1-puudulikkusega homosügootsetel ja metsiktüüpi hiirtel ning hinnata pluss-puuri mõju genotüüpide geeniekspressioonile. Ekspressiooni uuriti ajuosades, kus on kõrge Wfs1 ekspressioonitase, ning mis on seotud ärevuse regulatsiooniga (Luuk, *et al.*, 2008). Töö raames kasutatud Wfs1-puudulikkusega loomad olid tõstetud pluss-puuri katses tunduvamalt ärevamad kui metsiktüüpi hiired, eelistades suletud õlgadel viibimist ( $p < 0,05$ ) ning näidates riskikäitumise tunnuseid, kus loom venitab ennast uudistavalt pikaks, kuid tõmbub kiiresti puuri suletud õlga tagasi (avaldamata andmed). Varasemad katsed Tartu Ülikooli füsioloogia osakonnas on andnud sarnaseid tulemusi (Raud *et al.*, 2009). Lisaks on näidatud, et Wfs1-puudulikkus tõstab ER-stressiga seotud geenide mRNA ekspressiooni (Fonseca *et al.*, 2010). Käesoleva töö raames uuriti *Perk*, *Chop*, *Irela*, kogu *Xbp1*, splaissitud *Xbp1* ja *Atf6a* ekspressiooni pluss-puuris käinud homosügootsetel Wfs1-puudulikkusega ja metsiktüüpi hiirtel võrreldes kodupuurist võetud sama genotüübiga loomadel.

*Perk* mRNA ekspressioonil ventraalses striatumis ja oimusagaras genotüüpide vaheline erinevus puudus. Hipokampuses võis täheldada, et Wfs1-puudulikkusega hiirtel on nii tõstetud pluss-puuris käinud loomade kui kontrollgrupi loomade seas madalam *Perk* mRNA ekspressioon võrreldes vastavate gruppide metsiktüüpi hiirtega, kuid tulemused polnud statistiliselt olulised. Oimusagaras ja hipokampuses oli märgata, et pluss-puur alandab, sõltumata genotüübist, *Perk* mRNA ekspressioonitaset. Kuna sellisel juhul võib rakkudel stressitingimustes puududa võime PERK-i aktiveerida ning valgusünteesi peatada (Yamaguchi *et al.*, 2008), jätkub võtmata valkude kogunemine ER-i, süvendades ER-stressi. Ventraalses striatumis võis täheldada, et pluss-puur indutseerib, sõltumata genotüübist, *Perk* mRNA ekspressiooni. Kuna on teada, et PERK aktiveerimine peatab valgusünteesi, mida neuronitel on vaja sünapside normaalseks toimimiseks ning on näidatud seost aktiivse PERK ekspressioonitaseme tõusu ning sünapside hulgade vähenemise vahel (Harding *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 2012; Bell *et al.*, 2016), siis võib oletada, et stressitingimustes ventraalses striatumis rakkudevahelised sünapsid ei toimi enam normaalselt. Wfs1-puudulikkusega loomadel, kellel on ka teised UPR rajad häiritud (Fonseca *et al.*, 2010), süveneb ER-stress veelgi ning rakud võidakse suunata apoptoosi.

Hipokampuses ja oimusagaras ei täheldatud *Chop* mRNA ekspressioonitasemetes gruppide vahel olulisi erinevusi. Ventraalses striatumis, kus on kõrge Wfs1 ekspressiooni tase (Luuk *et al.*, 2008), esines statistiliselt oluline mRNA ekspressioonitaseme langus pluss-puuris käinud

Wfs1-puudulikkusega hiirtel võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega. Samuti võis täheldada, et pluss-puur indutseeris metsiktüüpi hiirtel *Chop* ekspressiooni, kuid Wfs1-puudulikel loomadel sama efekt puudus. Kuna CHOP takistab temaga samasse perekonda kuuluvate valkude ekspressiooni, inhibeerides transkriptsiooni (Barone *et al.*, 1994; Ron ja Habener, 1992), võib järeldada, et ventraalses striatumis ei toimu stressitingimustel CHOP vahendatud transkriptsiooni inhibeerimist ning viltumata valgud kuhjuvad ER-ile, süvendades ER-stressi. Tulenevalt genotüüpide vahelisest *Chop* mRNA ekspressiooni erinevusest pluss-puuris käinud loomade vahel, uuriti *Chop* geeni avaldumist ventraalse striatumi tuumades ka valgu tasemel, kus statistiliselt olulisi erinevusi genotüüpide vahel ei tuvastatud. mRNA tasemete muutuste mittekajastumine valgu hulgas võib olla tingitud meetodite tundlikkuse erinevusest. Kvantitatiivse reaali-aja PCR-iga on võimalik detekteerida ka väikeseid muutusi, samas kui *Western-blot*'iga peavad muutused valgu hulgas olema detekteerimiseks oluliselt suuremad. Lisaks võib ka 5-minutiline tõstetud pluss-puuris viibimise aeg olla liiga lühike, et tekiks muutused valgu tasemel. On näidatud, et pikaajaline, enam kui 12 päeva pikkune sotsiaalne isolatsioon põhjustab kroonilist stressi, mille tulemusena suurenesid CHOP ja Grp78 valgu tasemed amügdalas, eesaju koores ja hipokampuses (Huang *et al.*, 2013), millest võib järeldada, et pikaajaline stress põhjustab ER-stressiga seotud geenide ekspressioonis oluliselt suuremaid muutusi.

On näidatud, et XBP1 osaleb *Wfs1* aktivatsioonil ning inhibeerib ER-stressi poolt indutseeritud apoptoosi (Guo *et al.* 2013; Kakiuchi 2006). Kuna statistiliselt olulised erinevused kogu *Xbp1* mRNA ekspressioonil loomarühmade vahel kõigis uuritud ajuosades puudusid, otsustati lisaks vaadata ka aktiivset XBP1s valku kodeeriva splaissitud *Xbp1* mRNA ekspressiooni. Nii hipokampuses kui oimusagaras võis näha, et pärast pluss-puuri oli metsiktüüpi ja Wfs1-puudulike hiirte splaissitud *Xbp1* ekspressioonitase võrreldes vastavate genotüüpide naiivsete loomadega tõusnud. Ventraalses striatumis oli pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtel oluliselt kõrgem splaissitud *Xbp1* ekspressioon võrreldes pluss-puuri läbinud Wfs1-puudulike loomadega. Lisaks võis täheldada, et pluss-puur indutseeris metsiktüüpi loomadel splaissitud *Xbp1* ekspressiooni, kuid Wfs1-puudulikkusega hiirtel splaissitud *Xbp1* ekspressioonis naiivsete ja pluss-puuris käinud loomade vahel erinevust polnud. Nende tulemuste põhjal võib oletada, et kuna Wfs1-puudulikkusega hiirtel ei toimu ventraalses striatumis stressi-tingimustel aktiivset *Xbp1* splaissimist, puudub seal ka XBP1 apoptoosi inhibeeriv mõju ning rakud määratakse hukule. Oimusagaras (sisaldab amügdalat), kus WFS1 ekspressioon on väga kõrge (Luuk *et al.*, 2008), oli splaissitud *Xbp1* mRNA tase oluliselt tõusnud pluss-puuris käinud Wfs1-puudulikkusega loomadel võrreldes sama genotüübi naiivsete loomadega. Kuna

amügdala moodustab oimusagarast ainult väga väikese osa, ei pruugi antud tulemused amügdalas toimuvaid ekspressiooni muutusi väga hästi peegeldada. Täpsema tulemuse annaks immunohistokeemiline uuring, mis võimaldab ajustruktuure paremini eristada, samas on meetodi tundlikkus oluliselt madalam kui näiteks kvantitatiivse reaalaaja PCR-il. Valgu tasemel uuriti XBP1s suhet kogu XBP1-ga nii ventraalse striatumi kui hipokampuse tsütosoolis, kuid statistiliselt olulisi erinevusi valguekspressioonis ei täheldatud.

Eelnevalt on näidatud, et WFS1 on ER membraanis HRD1 kaudu seotud ATF6 $\alpha$ -ga, kontrollides viimase aktivatsiooni (Fonseca *et al.*, 2010). Leidsime, et tõstetud pluss-puur ei omanud *Atf6a* mRNA ekspressioonitasemele ventraalses striatumis ja oimusagaras olulist mõju. Füsioloogia osakonnas varasemalt teostatud katsed on näidanud, et *Atf6a* ekspressiooni tase pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootide hipokampuses on oluliselt madalam võrreldes sama genotüübi kontrollgrupi hiirtega (avaldamata andmed). Sellest tulenevalt vaadati ATF6 $\alpha$  ekspressiooni hipokampuse tuumades valgu tasemel. Loomarühmade vahel statistiliselt olulisi erinevusi polnud, kuid oli märgata, et pluss-puuri mõjul metsiktüüpi hiirte ATF6 $\alpha$  ekspressioonitase tõusis, aga *Wfs1*-puudulikkusega homosügootidel langes. Seega on tõstetud pluss-puuril ATF6 $\alpha$  ekspressioonil genotüüpidele erinev mõju. On näidatud, et *Wfs1*-puudulikkuse korral ei suunata ATF6 degradeerimisele, vaid ta indutseerib tuumas ER-stressi vastuseks vajalike geenide ekspressiooni (Fonseca *et al.*, 2010).

Ventraalses striatumis ei esinenud *Irela* mRNA ekspressioonil gruppide vahel olulisi erinevusi. Kuna IRE1 käitub ER-stressi sensorina ning viib tsütosoolis läbi *Xbp1* mRNA splaissimist (Yoshida *et al.*, 2001; Caflon *et al.*, 2005) ning ka antud töös näidati ventraalses striatumis gruppide vahel statistiliselt olulisi erinevusi splaissitud *Xbp1* mRNA ekspressioonil, otsustati vaadata fosforüleeritud IRE1 $\alpha$  hulka võrreldes kogu IRE1 $\alpha$  hulgaga ventraalse striatumi tsütosoolis. Statistiliselt olulised erinevused pIRE1 $\alpha$  ekspressioonil gruppide vahel puudusid, kuid võis märgata, et naiivsetel *Wfs1*-puudulikkusega hiirtel on kõrgem ekspressiooni tase kui metsiktüüpi hiirtel. On näidatud, et pikaajaline stress posttraumaatilise stressi mudeli rottidel aktiveerib IRE1-XBP1 signaalraja, suurendades IRE1 $\alpha$ , XBP1u ja kogu XBP1 ekspressiooni eesaju koos (Li *et al.*, 2015; Wen *et al.*, 2016), mis viitab antud raja olulisusele stressivastuse regulatsioonis.

Antud tulemuste põhjal võib väita, et uuritud ajuosades esineb pluss-puuri mõjul erinevusi mõnede ER-stressiga seotud geenide mRNA ekspressioonitasemetes. Valgu tasemel olulisi erinevusi ei täheldatud, mis võib tuleneda meetodi vähesest tundlikkusest või liiga lühiajalisest stressist.

## KOKKUVÕTE

Wolframi sündroom on põhjustatud mutatsioonidest *WFS1* geenis (Inoue *et al.*, 1998). Varasemalt on näidatud, et *WFS1* osaleb ER-stressi vastuse tekkimisel ning *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsed hiired on tõstetud pluss-puuri katses ärevamad kui metsiktüüpi hiired (Raud *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2010). Käesolevas töös uuriti ER-stressiga seotud geenide (*Perk*, *Chop*, *Irela*, *Xbp1* ja *ATF6a*) ekspressiooni ventraalses striatumis, hipokampuses ja oimusagaras tõstetud pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega homosügootsetel ja kontrollgrupi hiirtel võrreldes metsiktüüpi hiirtega.

Ventraalses striatumis leidsime, et splaissitud *Xbp1* ja *Chop* ekspressioon mRNA tasemel langes tunduvalt tõstetud pluss-puuris käinud *Wfs1*-homosügootsetel hiirtel võrreldes pluss-puuris käinud metsiktüüpi hiirtega. Lisaks tõi splaissitud *Xbp1* ekspressioon ventraalses striatumis välja tõstetud pluss-puuri erineva mõju genotüüpidele, kus metsiktüüpi hiirte ekspressioon pärast pluss-puuris viibimist oluliselt tõusis, kuid *Wfs1*-homosügootsetel hiirtel hoopis natuke langes. *Chop* ekspressioonil võis märgata tõstetud pluss-puuri sarnast efekti, kuid tulemus polnud statistiliselt oluline.

Hipokampuses puudusid uuritud geenide mRNA ekspressioonil olulised erinevused, kuid *Perk* ekspressioonil võis täheldada *Wfs1*-homosügootidel mRNA taseme langust võrreldes metsiktüüpi hiirtega nii tõstetud pluss-puuris käinud loomade kui naiivsete loomade seas. Samuti võis näha mõningaid erinevusi splaissitud *Xbp1* ekspressioonil, kus nii metsiktüüpi hiirtel kui ka *Wfs1*-homosügootidel oli ekspressioonitase pärast pluss-puuris käimist mõnevõrra tõusnud.

Oimusagaras võis täheldada olulist splaissitud *Xbp1* mRNA ekspressioonitaseme tõusu pluss-puuris käinud *Wfs1*-homosügootidel võrreldes sama genotüübi naiivsete loomadega, kuid ülejäänud uuritud geenide ekspressioonil olulisi erinevusi gruppide vahel ei täheldatud.

Kuna ventraalses striatumis ja hipokampuses esines mRNA ekspressioonitasemetes nii märgatavaid kui ka statistiliselt olulisi erinevusi, siis uuriti osade geenide ekspressiooni nendes ajuosades ka valgu tasemel. Ühegi valgu puhul ei saanud gruppide vahel täheldada ekspressioonis statistiliselt olulisi erinevusi. Sellegipoolest tuli *ATF6a* ekspressioonil hipokampuses välja tõstetud pluss-puuri erinev mõju genotüüpidele, kus metsiktüüpi hiirtel valgu ekspressioonitase pärast pluss-puuris käimist tõusis, kuid *Wfs1*-homosügootidel hoopis langes.

Käesolevas töös tuvastati suuremaid muutusi splaissitud *Xbp1* ning *Chop* mRNA ekspressioonis tõstetud pluss-puuris käinud *Wfs1*-puudulikkusega hiirte ja metsiktüüpi hiirte

ning samade genotüüpide kontrollgrupi loomade vahel ventraalses striatumis ja hipokampuses. Lisaks täheldati väiksemaid, kuid märgatavaid erinevusi ka teiste geenide ja ajuosade puhul. Saadud tulemused viitavad sellele, et kuna Wfs1-puudulikkusega hiirtel tekivad olulised muutused mRNA ekspressioonitasemes juba pärast lühiajalist stressi, võib oletada, et ER-stressi geenid on Wfs1-puudulikkuse korral seotud suurenenud ärevuse ning kohanemiskustega. Edasiste uuringute jaoks oleks katseid vaja teostada pikemaajalise stressi mudeliga.

## SUMMARY

### **The effects of elevated plus-maze on endoplasmatic reticulum stress related genes in Wfs1-deficient mice**

Wolfram syndrome is a neurodegenerative disease caused by the mutations in the *WFS1* gene and the symptoms include diabetes mellitus, diabetes insipidus, optic atrophy, deafness and other neurological disturbances (Wolfram and Wagener, 1938; Inoue *et al.*, 1998, Strom; *et al.*, 1998). The product of the *Wfs1* gene which is highly expressed in various parts of the brain is known to participate in the endoplasmatic reticulum (ER) stress response pathways (Takeda *et al.*, 2001; Luuk *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2010).

The accumulation of unfolded proteins in the ER lumen cause ER-stress which triggers the unfolded protein response (UPR) that can either restore the homeostasis of the ER or induce apoptosis. UPR is mediated by three transmembrane ER receptors PERK, IRE1 and ATF6 (Schamu *et al.*, 1996; Schröder and Kaufman, 2005; Ron and Walter, 2007).

It has been previously shown that compared to wildtype animals, *Wfs1*-deficient mice have increased anxiety after being exposed to the elevated plus-maze (EPM) (Raud *et al.*, 2009). The goal of the present work was to determine the levels of mRNA and protein expression of ER-stress related genes (*Perk*, *Chop*, *Irel*, *Xbp1* and *Atf6*) in ventral striatum, hippocampus and temporal lobe of the homozygous *Wfs1*-deficient and wildtype mice after exposure to the EPM. We found that the expression levels of spliced *Xbp1* and *Chop* in ventral striatum were significantly higher in *Wfs1*-deficient mice compared to the wildtype animals after exposure to the EPM. In addition, we could see that EPM has different effect on genotypes where the spliced *Xbp1* mRNA expression levels were significantly higher in wildtype mice after being exposed to the EPM compared to the naive wildtype mice but were a little lower in *Wfs1*-deficient mice. However, in temporal lobe the spliced *Xbp1* mRNA expression levels were significantly higher in *Wfs1*-deficient mice after exposure to the EPM compared to the naive animals of the same genotype.

Expression levels of the ER-stress related genes in hippocampus did not show any significant differences, likewise the protein expression levels in ventral striatum and hippocampus. Nevertheless, we detected that on ATF6 $\alpha$  expression in hippocampus genotypes are differently affected by EPM where the ATF6 $\alpha$  expression levels after the exposure to the EPM in wildtype mice were significantly higher compared to the naive wildtype mice, but were lower in *Wfs1*-deficient mice.

In the present work we identified changes in the expression of spliced *Xbp1* and *Chop* mRNA between Wfs1-deficient and wildtype mice after being exposed to the EPM in ventral striatum and hippocampus. The results indicate that since there are changes in mRNA expression levels of the ER stress related genes in Wfs1-deficient mice after short-term stress, the ER stress related genes are in case of Wfs1-deficiency related to increased anxiety and adaption inabilities.

## TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajaid, Silva Sütti, Alina Altperet ning Lilian Kadaja-Saarepuud igakülgse toetuse ja asjakohaste nõuannete eest, mis olid suureks abiks käesoleva töö valmimisel. Lisaks avaldaksin tänu Tartu Ülikooli Bio-ja siirdemeditiini instituudi füsioloogia osakonna töötajatele, kellest eraldi tootsin välja Sirli Raua, kes viis katseloomadel läbi antud töö raames vajaminevad käitumiskatsed. Suurim tänu ka minu perekonnale ja lähedastele, kes olid mulle käesoleva töö valmimise ajal igati toeks.



## KASUTATUD KIRJANDUS

Barrett, T. G., Bunday, S. E. (1997). Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *J Med Genet* 34(10): 838-841.

Barrett, T. G., Bunday, S. E., Macleod, A. F. (1995). Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 346(8988): 1458-1463.

Barone, M. V., Crozat, A., Tabaei, A., Philipson, L., Ron, D. (1994). CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G<sub>1</sub>/S arrest. *Genes Dev* 8(4): 453-464.

Bell, M. C., Meier, S. E., Ingram, A. L., Abisambra, J. F. (2016). PERK-Optathies: An endoplasmic reticulum stress Mechanism underlying neurodegeneration. *Curr Alzheimer Res* 13(2): 150-163.

Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2(6): 326-332.

Blanco-Aguirre, M. E., la Parra, D. R., Tapia-Garcia, H., Gonzalez-Rodriguez, J., Welskin, D., Arroyo-Yllanes, M. E., Escudero, I., Nunez-Hernandes, J. A., Medina-Bravo, P., Zenteno, J. C. (2015). Identification of unsuspected Wolfram syndrome cases through clinical assessment and WFS1 gene screening in type 1 diabetes mellitus patients. *Gene* 566(1): 63-37.

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415(6867): 92-96.

Chaussonot, A., Bannwarth, S., Rouzier, C., Vialettes, B., Mkadem, S. A., Chabrol, B., Cano, A., Labauge, P., Paquis-Flucklinger, V. (2011). Neurologic features and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Ann Neurol* 69(3): 501-508.

Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M., Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *PNAS U S A* 102(52): 18773-18784.

Dimauro, I., Pearson, T., Caporossi, D., Jackson, M. J. (2012). A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Res Notes* 5: 513.

- Fonseca, S. G., Fukuma, M., Lipson, K. L., Nguyen, L. X., Allen, J. R., Oka, Y., Urano, F. (2005). WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 280(47): 39609-39615.
- Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Osowski, C. M., Lu, S., Lipson, K. L., Ghosh, R., Hayashi, E., Ishihara, H., Oka, Y., Permutt, M. A., Urano, F. (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* 120(3): 744-755.
- Ghosh, R., Wang, L., Wang, E. S., Perera, B. G. K., Igbaria, A., Morita, S., Prado, K., Thamsen, M., Caswell, D., Macias, H., Weiberth, K. F., Gliedt, M. J., Alavi, M. V., Hari, S. B., Mitra, A. K., Bhatarai, B., Schürer, S. C., Snapp, E. L., Gould, D. B., German, M. S., Backes, B. J., Maly, D. J., Oakes, S. A., Papa, F. R. (2014). Allosteric inhibition of the IRE1 $\alpha$  RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell* 158(3): 534-548.
- Guo, F. J., Xiong, Z., Lu, X., Ye, M., Han, X., Jiang, R. (2013). ATF6 upregulates XBP1S and inhibits ER stress-mediated apoptosis in osteoarthritis cartilage. *Cell Signal* 26(2): 332-342.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397(6716): 271-274.
- Haze, K., Okada, T., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., Mori, K. (2001). Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 355(Pt 1): 19-28.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10(11): 3787-3799.
- Healy, S. J. M., Gorman, A. M., Mousavi-Shafaei, P., Gupta, S., Samali, A. (2009). Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol* 625(1-3): 234-246.
- Hofmann, S. (2003). Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Human Molecular Genetics* 12(16): 2003-2012.

Huang, G. B., Zhao, T., Muna, S. S., Bagalkot, R. R., Jin, H. M., Chung, Y. C. (2013). Effects of chronic social defeat stress on behaviour, endoplasmatic reticulum proteins and choline acetyltransferase in adolescent mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 16(7): 1635-1647.

Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., Behn, P., Kalidas, K., Bernal-Mizrachi, E., Mueckler, M., Marshall, H., Donis-Keller, H., Crock, P., Rogers, D., Mikuni, M., Kumashiro, H., Higashi, K., Sobue, G., Oka, Y., Permutt, M. A. (1998). A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet* 20(2): 143-148.

Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Yamada, T., Inoue, H., Soga, H., Katagiri, H., Tanizawa, Y., Oka, Y. (2004). Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* 13(11): 1159-1170.

Johannessen, C. U. (2000). Mechanisms of action of valproate: a commentary. *Neurochem Int* 37(2-3): 103-110.

Johannessen, C. U., Johannessen, S. I. (2003). Valproate: Past, Present, and Future. *CNS Drug Rev* 9(2): 199-216.

Kakiuchi, C., Ishigaki, S., Osowski, C. M., Fonseca, S. G., Kato, T., Urano, F. (2009). Valproate, a mood stabilizer, induces WFS1 expression and modulates its interaction with ER stress protein GRP94. *PLoS One* 4(1): e4134.

Kakiuchi, C., Ishiwata, M., Hayashi, A., Kato, T. (2006). XBP1 induces WFS1 through an endoplasmic reticulum stress response element-like motif in SH-SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry* 97(2): 545-555.

Kardosh, A., Golden, E. B., Pyrko, P., Uddin, J., Hofman, F. M., Chen, T. C., Louie, S. G., Petasis, N. A., Schöenthal, A.H. (2008). Aggrevated endoplasmatic reticulum stress as a basis for enhanced glioblastoma cell killing by bortezomib in combination with celecoxib or its non-coxib analogue, 2,5-dimethyl-celecoxib. *Cancer Res* 68(3): 843-851.

Kato, T., Ishiwata, M., Yamada, K., Kasahara, T., Kakiuchi, C., Iwamoto, K., Kawamura, K., Ishihara, H., Oka, Y. (2008). Behavioral and gene expression analyses of Wfs1 knockout mice as a possible animal model of mood disorder. *Neurosci Res* 61(2): 143-158.

- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. J., Sambrook, J. (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332(6163): 462-464.
- Lee, A. S. (1992). Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Curr Opin Cell Biol* 4(2): 267-273.
- Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology* 23(21): 7448-7459.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., Kaufman, R. J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 16(4): 452-466.
- Li, J., Lee, A. S. (2006). Stres induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med* 6(1): 45-54.
- Li, X., Han, F., Shi, Y. (2015). IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway is activated upon induction of single prolonged stress in rat neurons of the medial prefrontal cortex. *J Mol Neurosci* 57(1): 63-72.
- Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., LaVail, M. M., Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during unfolded protein response. *Science* 318(5852): 944-949.
- Lin, J. H., Li, H., Zhang, Y., Ron, D., Walter, P. (2009). Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS One* 4(1): e4170.
- Lister, R. G. (1978). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92(2): 180-185.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Lombardo, F., Salzano, G., Di Bella, C., Aversa, T., Pugliatti, F., Cara, S., Valenzie, M., De Luca, F., Rigoli, L. (2014). Phenotypical and genotypical expression of Wolfram syndrome in 12 patients from a Sicilian district where this syndrome might not be so infrequent as generally expected. *J Endocrinol Invest* 37:195–202

- Luuk, H., Koks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J. F., Vasar, E. (2008). Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *J Comp Neurol* 509(6): 642-660.
- Luuk, H., Plaas, M., Raud, S., Innos, J., Sutt, S., Lasner, H., Abramov, U., Kurrikoff, K., Koks, S., Vasar, E. (2008). Wfs1-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behav Brain Res* 198(2): 334-345.
- Ma, Y., Hendershot, L. M. (2004). ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat* 28(1-2): 51-65.
- Marshall, B. A., Permutt, M. A., Paciorkowski, A. R., Hoekel, J., Karzon, R., Wasson, J., Viehover, A., White, N. H., Shimony, J. S., Manwaring, L., Austin, P., Hullar, T. E., Hershey, T. (2013). Phenotypic characteristics of early Wolfram syndrome. *Orphanet j Rare Dis* 8:64.
- Matsumoto, M., Minami, M., Takeda, K., Sakao, Y., Akira, S. (1996). Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Lett* 395(2-3): 143-147.
- Moreno, J. A., Radford, H., Peretti, D., Steinert, J. R., Verity, N., Martin, M. G., Halliday, M., Morgan, J., Dinsdale, D., Ortori, C. A., Barrett, D. A., Tsaytler, P., Bertolotti, A., Willis, A. E., Bushell, M., Mallucci, G. R. (2012). Sustained translational repression by eIF2 $\alpha$ -P mediates prion neurodegeneration. *Nature* 485(7399): 507-511.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 552-565.
- Philbrook, C., Fritz, E., Weiher, H. (2005). Expressional and functional studies of Wolframin, the gene function deficient in Wolfram syndrome, in mice and patient cells. *Exp Gerontol* 40(8-9): 671-678.
- Raud, S., Sutt, S., Luuk, H., Plaas, M., Innos, J., Koks, S., Vasar, E. (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  subunits of GABA(A) receptors in Wfs1-deficient mice. *Neurosci Lett* 460(2): 138-142.
- Renart, J., Reiser, J., Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7): 3116-3120.

- Rigoli, L., Lombardo, F., Di Bella, C. (2011). Wolfram syndrome and WFS1 gene. *Clin Genet* 79(2): 103-117.
- Ron, D., Habener, J. F. (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* 6(3): 439-453.
- Ron, D., Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 519-529.
- Rosenberg, G. (2007). The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? *Cell Mol Life Sci* 64(16): 2090-2103.
- Rutkowski, D. T., Kaufman, R. J. (2007). That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci* 32(10): 469-476.
- Schroder, M., Kaufman, R. J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569(1-2): 29-63.
- Shamu, C. E., Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J* 15(12): 3028-3039.
- Shen, X., Ellis, R. E., Lee, K., Liu, C. Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D. M., Mori, K., Kaufman, R. J. (2001). Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* 107(7): 893-903.
- Strom, T. M., Hortnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K. D., Meitinger, T. (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet* 7(13): 2021-2028.
- Swift, R. G., Polymeropoulos, M. H., Torres, R., Swift, M. (1998). Predisposition of Wolfram syndrome heterozygotes to psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 3(1): 86-91.
- Swift, R. G., Sadler, D. B., Swift, M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet* 336(8716): 667-669.

- Tabas, I., Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13(3): 184-190.
- Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K., Oka, Y. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Molecular Genetics* 10(5): 477-484.
- Terasmaa, A., Soomets, U., Oflijan, J., Punapart, M., Hansen, M., Matto, V., Ehrlich, K., Must, A., Koks, S., Vasar, E. (2011). Wfs1 mutation makes mice sensitive to insulin-like effect of acute valproic acid and resistant to streptozocin. *J Physiol Biochem* 67(3): 381-390.
- Tirasophon, W., Welihinda, A. A., Kaufman, R. J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes & Development* 12(12): 1812-1824.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Wang, X. Z., Harding, H. P., Zhang, Y., Jolicoeur, E. M., Kuroda, M., Ron, D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* 17(19): 5708-5717.
- Wen, L., Han, F., Shi, Y., Li, X. (2016). Role of the endoplasmic reticulum pathway in the medial prefrontal cortex in the post-traumatic stress disorders model rats. *J Mol Neurosci*
- Wolfram, D. D., Wagener, H. P. (1938). Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clin Proc* 13: 715-718.
- Wu, J., Rutkowski, D. T., Dubois, M., Swathirajan, J., Saunders, T., Wang, J., Song, B., Yau, G. D., Kaufman, R. J. (2007). ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell* 13(3): 351-364.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., Reed, J. C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115(10): 2656-2664.

- Yamaguchi, Y., Larkin, D., Lara-Lemus, R., Ramos-Castaneda, J., Liu, M., Arvan, P. (2008). Endoplasmatic reticulum (ER) chaperone regulation and survival of cells compensating for deficiency in the ER stress response kinase, PERK. *J Biol Chem* 283(25): 17020-17029.
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6(6): 1355-1364.
- Yoshida, H. (1998). Identification of the cis-Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Responsible for Transcriptional Induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *Journal of Biological Chemistry* 273(50): 33741-33749.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107(7): 881-891.
- Zhou, J., Liu, C. Y., Back, S. H., Clark, R. L., Peisach, D., Xu, Z., Kaufman, R. J. (2006). The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *PNAS U S A* 103(39):14343-14348.



# LIHTLITSENTS

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Silvia Jänes (sünnikuupäev: 14.11.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose (Tõstetud pluss-puuri mõju endoplasmaatilise retiikulumi stressiga seotud geenide ekspressioonile Wfs1-puudulikkusega hiirtel), mille juhendajad on Silva Sütt, Lilian Kadaja-Saarepuu ja Alina Altpere.
  - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016